



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation: Nicht klassifiziert		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/11211 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. November 1989 (30.11.89)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/00579 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Mai 1989 (24.05.89) (30) Prioritätsdaten: P 38 17 591.6 24. Mai 1988 (24.05.88) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FÖRSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLÖCKER, Helmut [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit einer Erklärung gemäss Artikel 17 Absatz 2(a). Ohne Klassifikation und ohne Zusammenfassung: Bezeichnung von der Internationalen Recherchenbehörde nicht überprüft.</i>
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE BANK AND PROCESS FOR DNA SEQUENCING (54) Bezeichnung: OLIGONUCLEOTIDBANK UND VERFAHREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BG	Bulgarien	IT	Italien	SD	Sudan
BJ	Benin	JP	Japan	SE	Schweden
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

Oligonucleotidbank und Verfahren zur DNA-Sequenzierung

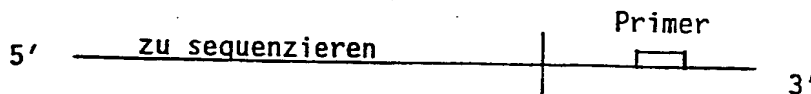
Die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten, insbesondere von DNA, ist als ein Schlüsselverfahren der modernen Biowissenschaften und der modernen Biotechnologie anzusehen. In letzter Zeit gerät mit der ständigen Verfeinerung der Sequenzierungstechniken auch die Analyse von ganzen, komplexen Genomen in den Bereich des Möglichen.

Neben einigen weniger populären Methoden werden heutzutage vor allem zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Sequenzanalyse angewandt, und zwar

- die Sequenzierung durch chemische Modifizierung und Abbau (Maxam/Gilbert-Methode) sowie
- die Sequenzierung durch kontrollierten Polymerase-Einbau unterschiedlicher Nucleotide (Sanger-Methode); vgl. beispielsweise Gassen & Schäfer, Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen, in: Gassen et al, Gentechnik, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, Seite 241 ff.

Die Sanger-Methode kann sowohl mit einzelsträngiger DNA, die speziell für den Zweck der Sequenzierung hergestellt wird, als auch seit wenigen Jahren mit jeder ausreichend reinen doppelsträngigen DNA durchgeführt werden. Ein durchgehendes Wesensmerkmal der Sanger-Methode bleibt jedoch unter anderem die Abhängigkeit der verwendeten Einbauenzyme (DNA-Polymerasen) sowohl von einer Matrize (Templat = zu sequenzierende DNA) als auch von einem Startmolekül (Primer). Der Primer ist in der Regel ein kurzes, chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das in seiner

ganzen Länge zu einem 3' von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt gelegenen Teilstück basenkomplementär ist:



Die Anheftungsstelle (Hybridisierungsstelle) des Primers muß derart gewählt sein, daß unter den experimentellen Bedingungen der Primer nur die gewünschte und keine einzige weitere Anheftungsstelle findet, um ein lesbares Sequenzierungsergebnis erreichen zu können. Die Spezifität des Primers hängt direkt von seiner Länge und der Komplexität der im Experiment verwendeten DNA ab. Aus statistischen Erwägungen und praktischer Erfahrung ergibt sich, daß Primer mit einer Kettenlänge von bis zu 24 Basen für alle denkbaren Fälle ausreichen sollten.

Bei der Sequenzanalyse sehr langer DNA (beispielsweise bei Genomsequenzierungen) werden gegenwärtig im wesentlichen zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie 1: Die Ein-Primer-Methode. Hierbei wird die zu sequenzierende DNA (je nach Verfahrensvariante) mehr oder weniger in Zufallsfragmente oder teilweise geordnete Fragmente zerlegt, wonach die Fragmente in ein und denselben Vektor inseriert werden. Nach Transformation von Zellen werden DNA-Präparationen von einzelnen Klonen hergestellt und der Sequenzanalyse unterworfen. Da sich alle DNA-Präparationen maximal um die inserierte DNA unterscheiden, kann für alle anstehenden Sequenzanalysen im Prinzip ein einziger Primer verwendet werden, der beispielsweise direkt neben der Insertionsstelle auf der Vektor-DNA hybridisiert. Diesem Vorteil stehen jedoch auch erhebliche Nachteile gegenüber,

- 3 -

- denn da die Klone zufällig ausgesucht werden müssen, werden einzelne Abschnitte der Original-DNA sehr oft weit häufiger als nötig sequenziert, und

- schließlich klaffen in der mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen zu einer Gesamtsequenz geordneten Sammlung der Teilsequenzierungsergebnisse häufig beträchtliche Lücken, da beispielsweise gewisse Abschnitte der zu analysierenden Original-DNA "schwer klonierbar" sind.

Strategie 2: Die Mehr-Primer-Methode. Die zu sequenzierende DNA wird hier nicht wie bei Strategie 1 nach der Schrotschuß-Methode, sondern gezielt progressierend analysiert. Der in einem Experiment noch sicher zu entschlüsselnde Sequenzabschnitt dient zur Auswahl einer Primer-Anheftungsstelle für das nächste Experiment und so fort. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß unnötige Mehrfachsequenzanalysen wie bei der Strategie 1 vermieden werden. Der wohl wesentliche Grund, warum diese Methode nicht allein für die Analyse langer DNA-Abschnitte verwendet wird, liegt in der Beschränkung durch die gegenwärtig verfügbaren Methoden zur chemischen DNA-Synthese.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die jeweiligen Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu mildern, beispielsweise durch das "Multiplex-Sequencing" bei Strategie 1 und das simultane progressierende Sequenzieren von verschiedenen Stellen aus bei Strategie 2. Ein Weg, den wesentlichen Nachteil der Strategie 2 ganz zu beseitigen, liegt theoretisch darin, eine Bank aller denkbaren Primer anzulegen. Dies ist jedoch durch direkte chemische Synthese praktisch nicht möglich, da es allein 4^{24} verschiedene Primer der Kettenlänge 24 gibt.

Erfindungsgemäß wird daher vorgeschlagen, kürzere, chemisch synthetisierte Oligonucleotide zu verwenden. Da jede längere Sequenz im Prinzip aus zwei oder mehr kürzeren Sequenzen zusammensetzbar ist, werden die dem gewünschten Primer entsprechenden

kurzen Oligonucleotide anstelle des gewünschten Primers zu der zu sequenzierenden DNA gegeben und durch eine

geeignete Prozedur, beispielsweise mit T4-DNA-Ligase, zu dem gewünschten Primer zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktion kann dann anschließend praktisch unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst.

Beispiel 1

In typischen Experimenten wurden ca. 2,5 pMol DNA des Plasmids pTZ18R (Pharmacia-LKB) mit NaOH denaturiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde mit je 2,5 pMol zweier verschiedener Oligonucleotidlösungen versetzt. Die Oligonucleotide der Kettenlänge 8 (Octamere) waren derart gewählt, daß sie unmittelbar benachbart auf einem Abschnitt bekannter Nucleotidsequenz der Plasmid-DNA hybridisieren konnten. Das 5'-Ende des im hybridisierten Zustand benachbart zum 3'-Ende des anderen Oligonucleotids gelegenen Octamers war zuvor nach gängigen Verfahren mit T4-Polynucleotid-Kinase und ATP phosphoryliert worden. Nach Einstellen der bekannten Pufferbedingungen für Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Versetzen mit 1 Einheit des Enzyms wurde die Lösung (10 µl Endvolumen) 4 h lang bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationslösung wurde vor der Sequenzierung 5 min lang bei 37 °C aufbewahrt, um möglichst viele durch Ligation entstandene 16-mere und möglichst wenige 8-mere hybridisieren zu lassen.

Die folgende Sequenzierung sollte dazu dienen, die Sequenz des gewählten Vektors zu überprüfen. Für die Sequenzierungsreaktion nach dem Standardprotokoll der Firma United States Biochemical Corporation (USB) wurden 8 µl der Ligationslösung eingesetzt. Abweichend von diesem Protokoll wurde auf das "Annealing" von Templat und Primer verzichtet.

Sofern die genannte Phosphorylierung in Gegenwart von [gamma-³²P]ATP durchgeführt worden war, wurde auf die spätere Verwendung von [α-³²P]dATP verzichtet.

-6-

Patentansprüche

1. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^6 verschiedenen hexameren Oligonucleotide.
2. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^7 verschiedenen heptameren Oligonucleotide.
3. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^8 verschiedenen octameren Oligonucleotide.
4. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^9 verschiedenen Oligonucleotide.
5. Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode, dadurch *gekennzeichnet*, daß man
 - (a) bei der zu sequenzierenden DNA eine einzelsträngige Primeranheftungsstelle bekannter Sequenz wählt,
 - (b) auf dieser Primeranheftungsstelle unmittelbar benachbart zwei hexamere, heptamere oder octamere Oligonucleotide (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) hybridisiert und
 - (c) ggf. gleichzeitig mit Stufe (b) oder nach Stufe (b) ein weiteres hexameres, heptameres oder octameres Oligonucleotid (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) unmittelbar benachbart zu

- 7 -

einem der beiden anderen Oligonucleotide auf der Primeranheftungsstelle hybridisiert und

(d) die Oligonucleotide zu einem Primer ligiert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch *gekennzeichnet*, daß man auf der Primeranheftungsstelle zwei Oligonucleotide hybridisiert und miteinander zu einem Prä-Primer ligiert und erst danach auf der Primeranheftungsstelle ein drittes Oligomeres hybridisiert und mit dem Prä-Primer ligiert.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch *gekennzeichnet*, daß man für die Primerbildung hexamere, heptamere und/oder octamere Oligonucleotide verwendet.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß man Oligonucleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende, sofern dieses Ende mit einem benachbarten Oligonucleotid mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert werden soll, phosphoryliert sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß man nach der Ligation und vor der Sequenzierung nicht zum gewünschten Primer ligierte Oligonucleotide durch Wärmebehandlung entfernt.

PATENT COOPERATION TREATY

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

issued pursuant to PCT Article 17(2) (a) ⁽¹⁾

IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION	APPLICANT'S OR AGENT'S FILE REFERENCE 5352-GBF
International Application No. PCT/EP 89/00579	International Filing Date 24 May 1989
Receiving Office RO/EP	Priority Date Claimed 24 May 1988
Applicant (Name) GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG mbH (GBF) et al.	Int. Cl. ⁴ C 12 N 15/00 C 12 Q 1/68

DECLARATION

This International Searching Authority hereby declares that no international search report will be established on the above-identified international application for the reasons indicated below. ⁽¹⁾

1. The subject matter of the international application relates to: ⁽²⁾
 - a. ☐ scientific theories.
 - b. ☐ mathematical theories.
 - c. ☐ plant varieties.
 - d. ☐ animal varieties.
 - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
 - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business.
 - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
 - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games.
 - i. ☐ methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
 - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
 - k. ☐ diagnostic methods.
 - l. ☐ mere presentations of information.
 - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.
2. ☒ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out: ⁽³⁾
 - a. ☐ the description.
 - b. ☒ the claims.
 - c. ☐ the drawings.

comment: Art. 17.2(a)(ii) The patent claims are not fully supported by the description.

CERTIFICATION		
International Searching Authority European Patent Office	Date of Mailing 12 September 1989 (12.09.89)	Authorized Officer

**VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

ERKLÄRUNG ÜBER DIE NICHTERSTELLUNG EINES INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a PCT¹

KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG	AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS 5352-GBF
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 89/00579	Internationales Anmeldedatum 24. Mai 1989
Anmeldeamt RO/EP	Beanspruchtes Prioritätsdatum 24. Mai 1988
Anmelder (Name) GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG mbH (GBF) et al.	Klassifikation der Anmeldung (int. Cl ⁴) C 12 N 15/00 C 12 Q 1/68
ERKLÄRUNG	
<p>Die Internationale Recherchenbehörde erklärt hiermit, daß für die oben genannte internationale Anmeldung aus den nachstehenden Gründen kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird.¹</p> <p>1. Der Gegenstand der internationalen Anmeldung betrifft folgende Gebiete:²</p> <ul style="list-style-type: none"> a. <input type="checkbox"/> wissenschaftliche Theorien. b. <input type="checkbox"/> mathematische Theorien. c. <input type="checkbox"/> Pflanzensorten. d. <input type="checkbox"/> Tierarten. e. <input type="checkbox"/> im wesentlichen biologische Verfahren zur Züchtung von Pflanzen und Tieren mit Ausnahme mikrobiologischer Verfahren und der mit Hilfe dieser Verfahren gewonnenen Erzeugnisse. f. <input type="checkbox"/> Pläne, Regeln und Verfahren für eine geschäftliche Tätigkeit. g. <input type="checkbox"/> Pläne, Regeln und Verfahren für rein gedankliche Tätigkeiten. h. <input type="checkbox"/> Pläne, Regeln und Verfahren für Spiele. i. <input type="checkbox"/> Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers. j. <input type="checkbox"/> Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des tierischen Körpers. k. <input type="checkbox"/> Diagnostizierverfahren. l. <input type="checkbox"/> bloße Wiedergabe von Informationen. m. <input type="checkbox"/> Programme von Datenverarbeitungsanlagen, für die die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Durchführung einer Recherche über den Stand der Technik ausgerüstet ist. <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Die folgenden Teile der internationalen Anmeldung entsprechen den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig, daß eine sinnvolle Recherche nicht durchgeführt werden kann.³</p> <ul style="list-style-type: none"> a. <input type="checkbox"/> die Beschreibung. b. <input checked="" type="checkbox"/> die Ansprüche. c. <input type="checkbox"/> die Zeichnungen. <p>Bemerkungen: Art. 17.2 (a)(ii) Die Patentansprüche werden nicht in vollen Umfang durch die Beschreibung gestützt.</p>	
BESCHEINIGUNG	
Internationale Recherchenbehörde EUROPÄISCHES PATENTAMT Zweigstelle in Den Haag P.B. 5818 Patentlaan, 2 2280 HV RIJSWIJK (ZH) / Niederlande Telex 31651 (070) 40-2040 · BREV · PATENT	Absenddatum <div style="font-size: 1.5em; font-weight: bold; text-align: center;">12 SEP. 1989</div>
Bevollmächtigter Bediensteter <div style="text-align: right; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">T.K. WILLIS</div>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12Q 1/68, C12N 15/00</p>	<p align="center">A3</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/11211 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. November 1989 (30.11.89)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/00579 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Mai 1989 (24.05.89) (30) Prioritätsdaten: P 38 17 591.6 24. Mai 1988 (24.05.88) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BLÖCKER, Helmut [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 8. März 1990 (08.03.90)</p>
<p>(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE BANK AND PROCESS FOR DNA SEQUENCING (54) Bezeichnung: OLIGONUCLEOTIDBANK UND VERFAHREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG (57) Abstract Oligonucleotide bank and process for DNA sequencing according to the multi-primer method. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine Oligonucleotidbank und ein Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Oligonucleotidbank und Verfahren zur DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten, insbesondere von DNA, ist als ein Schlüsselverfahren der modernen Biowissenschaften und der modernen Biotechnologie anzusehen. In letzter Zeit gerät mit der ständigen Verfeinerung der Sequenzierungstechniken auch die Analyse von ganzen, komplexen Genomen in den Bereich des Möglichen.

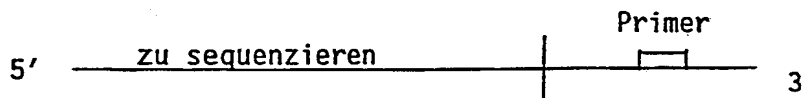
Neben einigen weniger populären Methoden werden heutzutage vor allem zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Sequenzanalyse angewandt, und zwar

- die Sequenzierung durch chemische Modifizierung und Abbau (Maxam/Gilbert-Methode) sowie
- die Sequenzierung durch kontrollierten Polymerase-Einbau unterschiedlicher Nucleotide (Sanger-Methode); vgl. beispielsweise Gassen & Schäfer, Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen, in: Gassen et al, Gentechnik, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, Seite 241 ff.

Die Sanger-Methode kann sowohl mit einzelsträngiger DNA, die speziell für den Zweck der Sequenzierung hergestellt wird, als auch seit wenigen Jahren mit jeder ausreichend reinen doppelsträngigen DNA durchgeführt werden. Ein durchgehendes Wesensmerkmal der Sanger-Methode bleibt jedoch unter anderem die Abhängigkeit der verwendeten Einbauenzyme (DNA-Polymerasen) sowohl von einer Matrize (Templat = zu sequenzierende DNA) als auch von einem Startmolekül (Primer). Der Primer ist in der Regel ein kurzes, chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das in seiner

- 2 -

ganzen Länge zu einem 3' von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt gelegenen Teilstück basenkomplementär ist:



Die Anheftungsstelle (Hybridisierungsstelle) des Primers muß derart gewählt sein, daß unter den experimentellen Bedingungen der Primer nur die gewünschte und keine einzige weitere Anheftungsstelle findet, um ein lesbares Sequenzierungsergebnis erreichen zu können. Die Spezifität des Primers hängt direkt von seiner Länge und der Komplexität der im Experiment verwendeten DNA ab. Aus statistischen Erwägungen und praktischer Erfahrung ergibt sich, daß Primer mit einer Kettenlänge von bis zu 24 Basen für alle denkbaren Fälle ausreichen sollten.

Bei der Sequenzanalyse sehr langer DNA (beispielsweise bei Genomsequenzierungen) werden gegenwärtig im wesentlichen zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie 1: Die Ein-Primer-Methode. Hierbei wird die zu sequenzierende DNA (je nach Verfahrensvariante) mehr oder weniger in Zufallsfragmente oder teilweise geordnete Fragmente zerlegt, wonach die Fragmente in ein und denselben Vektor inseriert werden. Nach Transformation von Zellen werden DNA-Präparationen von einzelnen Klonen hergestellt und der Sequenzanalyse unterworfen. Da sich alle DNA-Präparationen maximal um die inserierte DNA unterscheiden, kann für alle anstehenden Sequenzanalysen im Prinzip ein einziger Primer verwendet werden, der beispielsweise direkt neben der Insertionsstelle auf der Vektor-DNA hybridisiert. Diesem Vorteil stehen jedoch auch erhebliche Nachteile gegenüber,

- denn da die Klone zufällig ausgesucht werden müssen, werden einzelne Abschnitte der Original-DNA sehr oft weit häufiger als nötig sequenziert, und
- schließlich klaffen in der mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen zu einer Gesamtsequenz geordneten Sammlung der Teilsequenzierungsergebnisse häufig beträchtliche Lücken, da beispielsweise gewisse Abschnitte der zu analysierenden Original-DNA "schwer klonierbar" sind.

Strategie 2: Die Mehr-Primer-Methode. Die zu sequenzierende DNA wird hier nicht wie bei Strategie 1 nach der Schrotschuß-Methode, sondern gezielt progressierend analysiert. Der in einem Experiment noch sicher zu entschlüsselnde Sequenzabschnitt dient zur Auswahl einer Primer-Anheftungsstelle für das nächste Experiment und so fort. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß unnötige Mehrfachsequenzanalysen wie bei der Strategie 1 vermieden werden. Der wohl wesentliche Grund, warum diese Methode nicht allein für die Analyse langer DNA-Abschnitte verwendet wird, liegt in der Beschränkung durch die gegenwärtig verfügbaren Methoden zur chemischen DNA-Synthese.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die jeweiligen Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu mildern, beispielsweise durch das "Multiplex-Sequencing" bei Strategie 1 und das simultane progressierende Sequenzieren von verschiedenen Stellen aus bei Strategie 2. Ein Weg, den wesentlichen Nachteil der Strategie 2 ganz zu beseitigen, liegt theoretisch darin, eine Bank aller denkbaren Primer anzulegen. Dies ist jedoch durch direkte chemische Synthese praktisch nicht möglich, da es allein 4^{24} verschiedene Primer der Kettenlänge 24 gibt.

Erfindungsgemäß wird daher vorgeschlagen, kürzere, chemisch synthetisierte Oligonucleotide zu verwenden. Da jede längere Sequenz im Prinzip aus zwei oder mehr kürzeren Sequenzen zusammensetzbar ist, werden die dem gewünschten Primer entsprechenden

kurzen Oligonucleotide anstelle des gewünschten Primers zu der zu sequenzierenden DNA gegeben und durch eine

geeignete Prozedur, beispielsweise mit T4-DNA-Ligase, zu dem gewünschten Primer zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktion kann dann anschließend praktisch unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst.

Beispiel 1

In typischen Experimenten wurden ca. 2,5 pMol DNA des Plasmids pTZ18R (Pharmacia-LKB) mit NaOH denaturiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde mit je 2,5 pMol zweier verschiedener Oligonucleotidlösungen versetzt. Die Oligonucleotide der Kettenlänge 8 (Octamere) waren derart gewählt, daß sie unmittelbar benachbart auf einem Abschnitt bekannter Nucleotidsequenz der Plasmid-DNA hybridisieren konnten. Das 5'-Ende des im hybridisierten Zustand benachbart zum 3'-Ende des anderen Oligonucleotids gelegenen Octamers war zuvor nach gängigen Verfahren mit T4-Polynucleotid-Kinase und ATP phosphoryliert worden. Nach Einstellen der bekannten Pufferbedingungen für Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Versetzen mit 1 Einheit des Enzyms wurde die Lösung (10 µl Endvolumen) 4 h lang bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationslösung wurde vor der Sequenzierung 5 min lang bei 37 °C aufbewahrt, um möglichst viele durch Ligation entstandene 16-mere und möglichst wenige 8-mere hybridisieren zu lassen.

Die folgende Sequenzierung sollte dazu dienen, die Sequenz des gewählten Vektors zu überprüfen. Für die Sequenzierungsreaktion nach dem Standardprotokoll der Firma United States Biochemical Corporation (USB) wurden 8 µl der Ligationslösung eingesetzt. Abweichend von diesem Protokoll wurde auf das "Annealing" von Templat und Primer verzichtet.

Sofern die genannte Phosphorylierung in Gegenwart von [gamma- ^{32}P]ATP durchgeführt worden war, wurde auf die spätere Verwendung von [α - ^{32}P]dATP verzichtet.

Patentansprüche

1. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^6 verschiedenen hexameren Oligonucleotide.
2. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^7 verschiedenen heptameren Oligonucleotide.
3. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^8 verschiedenen octameren Oligonucleotide.
4. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 4^9 verschiedenen Oligonucleotide.
5. Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode, dadurch *gekennzeichnet*, daß man
 - (a) bei der zu sequenzierenden DNA eine einzelsträngige Primeranheftungsstelle bekannter Sequenz wählt,
 - (b) auf dieser Primeranheftungsstelle unmittelbar benachbart zwei hexamere, heptamere oder octamere Oligonucleotide (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) hybridisiert und
 - (c) ggf. gleichzeitig mit Stufe (b) oder nach Stufe (b) ein weiteres hexameres, heptameres oder octameres Oligonucleotid (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) unmittelbar benachbart zu

einem der beiden anderen Oligonucleotide auf der Primeranheftungsstelle hybridisiert und

(d) die Oligonucleotide zu einem Primer ligiert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch *gekennzeichnet*, daß man auf der Primeranheftungsstelle zwei Oligonucleotide hybridisiert und miteinander zu einem Prä-Primer ligiert und erst danach auf der Primeranheftungsstelle ein drittes Oligomeres hybridisiert und mit dem Prä-Primer ligiert.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch *gekennzeichnet*, daß man für die Primerbildung hexamere, heptamere und/oder octamere Oligonucleotide verwendet.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß man Oligonucleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende, sofern dieses Ende mit einem benachbarten Oligonucleotid mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert werden soll, phosphoryliert sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß man nach der Ligation und vor der Sequenzierung nicht zum gewünschten Primer ligierte Oligonucleotide durch Wärmebehandlung entfernt.

SA 29005

The members are as contained in the European Patent Office EDP file on **06/02/90**
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

EPO FORM P0479

B1 BNSDOCID: <WO 8911211A3 1 >

IN. RNATIONALER RECHERCHENBERICH

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 89/00579

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 4 C12Q1/68 ; C12N15/00

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷

Klassifikationssystem

Klassifikationssymbole

Int.Kl. 4

C12Q ; C12N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹

Art.⁹

Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²

Betr. Anspruch Nr. ¹³

Y

"Pharmacia Molecular Biological Catalogue"
Mai 1986, Rahm, (Lund, SE)
siehe Seiten 95 - 107

1-4

Y

DE,A,3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE
FORSCHUNG) 08 Dezember 1983
siehe Seite 7, Zeilen 11 - 30

1-4

A

DNA
vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New
York, US)
Seiten 339 - 343; R.Sanchez-Pescador et al.:
"Laboratory methods. Use of unpurified synthetic
deoxynucleotide primers for rapid
dideoxynucleotide chain termination sequencing"
siehe Zusammenfassung

5

¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"F" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"I" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"T" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHREIBUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. DEZEMBER 1989

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08 FEB 1990

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Repräsentanten

T.K. WILLIS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SA 29005

06/02/90

EPO FORM 00473

NSDOCID: <WO_____8911211A3_1_>

THIS PAGE BLANK (USPTO)